



# Rapport de stage

Master 2 Biologie Agrosociétés parcours  
Interaction Microorganismes Hôtes Environnement

## Comparaison d'itinéraires de fermentation alcoolique sur deux variétés de raisins : Sauvignac et Sauvignon

Par

Julie BALLAND

Responsable du stage : Vincent FARINES  
Jean-Roch MOURET

Laboratoire d'accueil : UMR SPO « Science pour l'œnologie »  
Campus de la Gaillarde  
34 000 MONTPELLIER, France

Rapporteurs : Mr Alain GIVAUDAN  
Mme Marie-Hélène BOYER  
Mme Anne-Sophie GOSSELIN-GRENET

Du 1 février au 28 juillet 2023



## Remerciements

Je voudrais remercier Madame Fabienne REMIZE (Directrice de l'unité) pour avoir pu rendre ce stage possible et de m'avoir accueilli dans les locaux de l'UMR SPO.

Je souhaiterais remercier Madame Camille BREYSSE ainsi que les différents partenaires de la Chaire d'entreprise Vigne et Vin, pour avoir rendu ce projet faisable.

Je remercie tout particulièrement Monsieur Vincent FARINES et Monsieur Jean-Roch MOURET, pour m'avoir encadré, aidé, soutenu et accompagné tout au long de mon stage. Mais également pour leur patience, leur bienveillance, leur humour, leur disponibilité et leur pédagogie qui m'ont permis d'acquérir de nombreuses connaissances, de la réflexion et l'autonomie.

Un grand merci à Madame Faïza MACNA pour son encadrement technique mais pas que... Je la remercie pour sa bonne humeur, sa confiance, ses encouragements, sa bienveillance, pour tous ces nombreux conseils qui me seront utiles pour le reste de mon avenir professionnel.

Un grand merci à Madame Charlie GUITTIN, pour sa gentillesse, son temps accordé, son accueil dans le bureau, sa bienveillance, son encouragement et son aide.

Je me dois de remercier Monsieur Christian PICOU, Monsieur Marc PEREZ, Madame Valérie NOLLEAU, Monsieur Teddy GODET et Monsieur Diego SECOND pour m'avoir enseigné et accompagné dans les diverses analyses que j'ai dû mener, avec bienveillance, pédagogie et patience.

Merci à Madame Lylia EL-AICHOUCI (alias « ma jumelle ») pour son aide, son humour et sa gentillesse.

Je remercie également l'ensemble de l'unité (permanents et non permanents) pour leur accueil, leur disponibilité, leur bienveillance, leur humour et leur bonne humeur qui font de SPO un endroit chaleureux et accueillant.

Pour finir je tiens à remercier toute l'équipe pédagogique de l'Université de Montpellier, responsable du parcours Interactions Microorganismes Hôtes Environnement.

Julie BALLAND



# Sommaire

I.	Introduction .....	1
	Contexte du sujet.....	1
	Fermentation alcoolique : processus et déroulement .....	2
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> en condition de fermentation.....	3
	Les nutriments et leur impact .....	3
	◇ Interaction entre l'azote assimilable et les lipides .....	4
	◇ Impact des lipides et de l'oxygène sur la fermentation .....	4
	◇ Relation entre nutriments et température sur la production d'arômes.....	4
II.	Matériels et méthodes .....	5
	Conditions de fermentation .....	5
	Population cellulaire et viabilité.....	6
	Détermination des composés du métabolisme carboné central (MCC) .....	7
	Quantification des arômes fermentaires .....	7
	Analyse statistique.....	7
III.	Résultats.....	8
	ACP générale.....	8
	Cinétiques de fermentation.....	8
	Métabolisme carboné central .....	9
	Arômes fermentaires .....	9
IV.	Discussion.....	10
	Impact des sucres sur la viabilité et temps de fermentation .....	10
	Impact des conditions de fermentation sur la concentration en acétate .....	11
	L'influence de l'oxygène sur la synthèse des métabolites du MCC .....	11
	L'ajout d'oxygène entraine une diminution de la synthèse des esters d'acétate.....	12
	L'ajout d'oxygène est responsable d'une diminution significative de la synthèse des esters d'éthyle et des acides gras volatils .....	12
V.	Conclusion.....	131
	Bibliographie.....	
	Annexes.....	



## I. Introduction

### Contexte du sujet

La culture de la vigne est régulièrement exposée à des maladies cryptogamiques particulièrement dommageables à la récolte. Il s'agit de maladies causées par des champignons, l'une des plus connues étant le mildiou causé par l'oomycète *Plasmopara viticola*. Afin de lutter au mieux contre ces pathogènes, des produits phytosanitaires sont couramment employés. Toutefois, de nouvelles attentes sociétales d'ordre environnemental et sanitaire imposent en parallèle à la viticulture une réduction des intrants et notamment des produits chimiques de synthèse permettant de lutter contre les maladies. Dans ce contexte, des cultivars résistants sont progressivement développés (Schneider *et al.*, 2019). C'est ainsi le cas de la variété Sauvignac, raisin blanc isolé dans un vignoble Suisse dans les années 1991. La particularité de cette variété réside dans sa résistance polygénique au mildiou portée par les loci *RPV12/RPV3* (Wingerter *et al.*, 2021) (*RPV* pour Résistance à *Plasmopara viticola*) et à l'oïdium (*Erysiphe necator*) portée par les loci *REN3/REN9*.

Si les variétés innovantes peuvent conférer des propriétés de résistance face aux maladies cryptogamiques (ou encore au stress hydrique dans un contexte de réchauffement climatique), il est important de caractériser le potentiel œnologique de ce nouveau matériel végétal. En ce sens, les premières recherches menées sur le Sauvignac (données internes au laboratoire obtenues en 2022) avaient montré que la nutrition lipidique apportée par l'ajout de bourbes de ce cépage avait un impact majeur sur le contrôle de la cinétique fermentaire. Cet ajout augmente la concentration en phytostérols ce qui permet indirectement d'augmenter la population levurienne et par conséquent d'induire une augmentation de la vitesse de fermentation et d'en réduire le temps.

Pour illustrer ces conclusions, le tableau 1 ci-après mentionne quelques résultats significatifs de fermentations réalisées en 2022 avec ce cépage pour deux concentrations en bourbes avec une levure œnologique commerciale (LSA3) :

Tableau 1- Comparaison de l'effet d'ajout de bourbes sur les différents paramètres cinétiques

<i>Pourcentage en bourbes ajoutées</i>	<i>1%</i>	<i>3%</i>
<i>Temps de fermentation (en heures)</i>	594	261
<i>Viabilité (en %)</i>	7.3	58.6
<i>Vitesse maximale de dégagement du CO<sub>2</sub> (en g de CO<sub>2</sub>/L/h)</i>	1.28	1.54

Ces premières données semblent indiquer que le Sauvignac peut présenter une carence lipidique à maturité ce qui pourrait rendre la fermentation alcoolique particulièrement sensible à ce paramètre. Ainsi, l'objectif premier de ce stage sera de comparer la variété Sauvignac avec le cépage traditionnel qu'est le Sauvignon sur le paramètre de la nutrition lipidique (1% et 3% de bourbes) en fermentation. Ce stage est réalisé dans le cadre la Chaire d'entreprises Vigne & Vin de l'Institut Agro Montpellier, INRAE et Université de Montpellier.



La chaire d'entreprises associe ces 3 partenaires académiques à un réseau d'entreprises de la filière vitivinicole dont les pépinières Mercier et Lallemand Oenologie, l'un des leaders mondiaux dans le développement et la production de biotechnologies dédiées à l'œnologie. Ainsi, au-delà de la comparaison des deux variétés de raisins fournies par les pépinières Mercier, deux levures (LSA2 et LSA3) et un nutriment riche en lipides (PT4) fournis par la société Lallemand ont été adossés à l'étude. L'ensemble des essais sera comparé à l'ajout d'O<sub>2</sub> en cours de fermentation qui permet la synthèse de lipides (ergostérol notamment) par la levure elle-même.

## **Fermentation alcoolique : processus et déroulement**

### **Processus**

La fermentation alcoolique (Figure 1), est une réaction anaérobie, initiée par une levure, généralement *Saccharomyces cerevisiae*. Cette réaction de conversion des sucres (glucose et fructose) en éthanol s'accompagne d'un dégagement de CO<sub>2</sub> :  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$

La conversion théorique est de 0.51g d'éthanol produit pour 1g de sucre consommé mais en pratique, ce ratio correspond à 0.47g d'éthanol produit pour 1g de sucre consommé, une partie du glucose (8 à 10 %) servant à la synthèse de précurseurs anaboliques nécessaires à la synthèse de biomasse et au maintien de l'équilibre redox au sein de la cellule.

Pour que la fermentation soit menée à terme, le milieu doit contenir les nutriments nécessaires au développement de la levure parmi lesquels on retrouve les sels minéraux, les vitamines, l'azote assimilable et les lipides.

### **Déroulement**

Le déroulement d'une fermentation alcoolique peut être considéré suivant 3 phases :

- La phase de latence (Figure 2, ❶) correspond à l'adaptation des levures à leur milieu et aux conditions expérimentales. Cette phase peut varier de quelques heures à plusieurs jours en fonction de la température, de la présence d'inhibiteurs (SO<sub>2</sub>), de la souche de levure et de son taux d'inoculation. Durant la phase de latence, le milieu se sature progressivement en CO<sub>2</sub> (jusqu'à environ 1.5 g/L).
- La phase de croissance (Figure 2, ❷) est associée à une multiplication de la biomasse jusqu'à l'obtention de la population maximale (50 à 250 × 10<sup>6</sup> cellules / mL). La fin de la phase de croissance est marquée par l'obtention de la vitesse maximale de fermentation (V<sub>max</sub>) avec la fin de la multiplication cellulaire corrélée à l'épuisement de l'azote assimilable composé d'ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), d'acides aminés et de petits peptides tels que le glutathion.
- La phase stationnaire (Figure 2, ❸) permet la consommation de l'essentiel des sucres fermentescibles. S'il n'y a plus de multiplication des levures, on constate une perte de vitesse en lien avec une diminution de la vitesse de transport des sucres liée à l'inhibition éthanol. En effet l'éthanol s'accumule dans le milieu entraînant un ralentissement du métabolisme des levures.

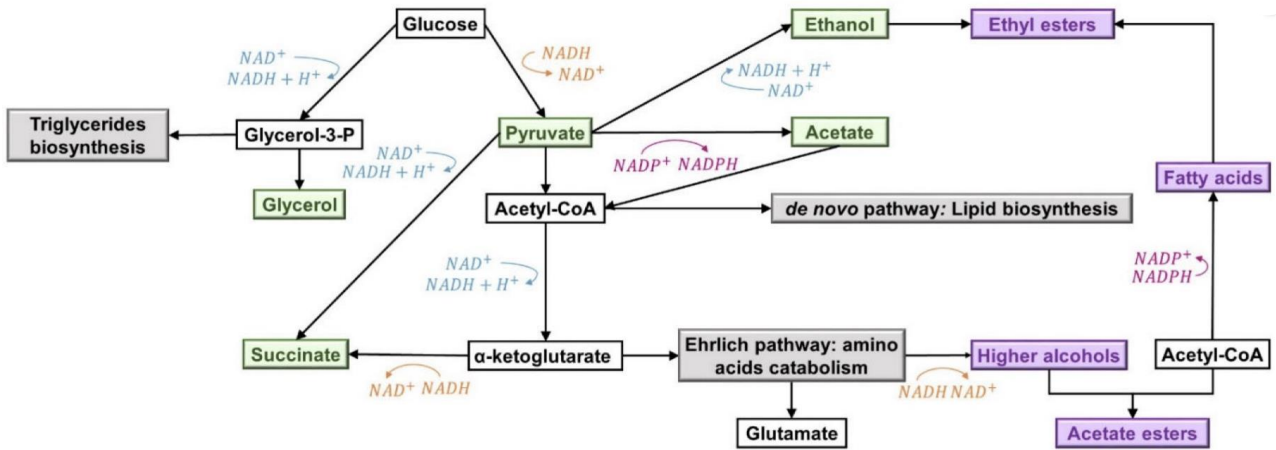
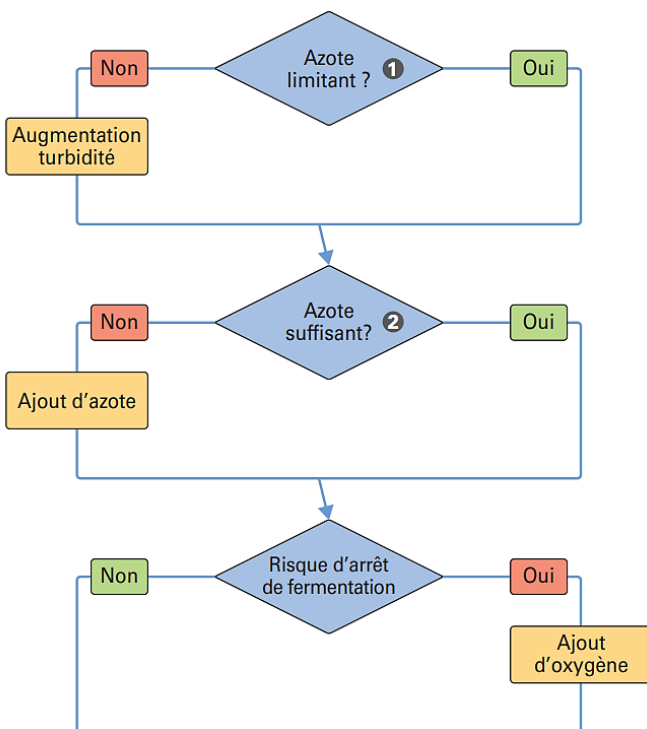


Figure 3- Biosynthèse des métabolites de la CCM (vert), des composés aromatiques (violet) et des voies associées (gris). Les réactions de réduction sont en orange et rose, les réactions d'oxydation sont en bleu (d'après (Girardi-Piva *et al.*, 2022)).



- ❶ L'azote est le nutriment limitant pour les levures. La totalité de l'azote assimilable est consommée
- ❷ L'azote assimilable est en quantité suffisante pour assurer une bonne vitesse de fermentation

Figure 4- Organigramme de la gestion nutritionnelle de la fermentation (Casalta *et al.*, 2021).

## ***Saccharomyces cerevisiae* en condition de fermentation**

*Saccharomyces cerevisiae* est une levure très utilisée dans le secteur de l'agroalimentaire (Eldarov *et al.*, 2016; Seguinot *et al.*, 2019). Il s'agit d'un organisme unicellulaire, ayant un génome à ADN double brin d'une taille environnant les 13 Mb et étant capable de réaliser de la respiration en aérobie comme de la fermentation en anaérobie. C'est une levure qui possède les caractéristiques favorables pour résister aux conditions de la fermentation alcoolique soit un pH acide, de fortes concentrations en sucres et en éthanol. De nombreux métabolites sont synthétisés tels que le glycérol, l'acétate ou encore des arômes fermentaires (Figure 3).

*S. cerevisiae* est soumise à l'effet Crabtree (Malina *et al.*, 2021) suivant lequel une forte concentration de glucose inhibe la respiration mitochondriale. Par conséquent, à des taux de croissance élevés, la fermentation est plus efficace en termes de masse protéomique nécessaire pour produire la même quantité d'ATP que la respiration.

### **Les nutriments et leur impact**

#### **- Azote**

L'azote assimilable fait référence à l'azote utilisable par les levures. Il est composé d'une partie minérale sous forme d'ion ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) et d'une partie organique provenant de la dégradation des acides aminés et de petits peptides. Dans un moût de raisins, le ratio azote minéral/organique s'établit à 1/3. En générale l'azote assimilable représente le nutriment le plus limitant dans les moûts pour les levures : il dispose ainsi d'un rôle essentiel sur la cinétique fermentaire. Les carences en azote assimilable sont les causes essentielles des fermentations lentes. Le seuil de « carence technologique » s'établit ainsi à 150-180 mg/L sous lequel il est recommandé d'ajouter des nutriments azotés en correction (Casalta *et al.*, 2021). Lorsque la concentration en azote initial dans le moût augmente, la population de levures et la vitesse maximale de fermentation augmentent (Figure 4), entraînant une réduction du temps de fermentation.

#### **- Lipides**

Les lipides sont présents dans les particules solides (bourbes) des moûts et ils constituent un second nutriment d'importance pour les levures. Ils proviennent des débris de la pellicule et de chair des baies de raisins (Casalta *et al.*, 2015). Les lipides permettent le maintien de la viabilité des levures au cours du cycle fermentaire en augmentant leur résistance au stress à l'éthanol par une régulation de la perméabilité et de la fluidité membranaire. Les lipides représentent environ 8% de la composition générale des bourbes majoritairement composées de sucres, d'azote, de minéraux et de pectines. Dans la fraction lipidique, on retrouve des phytostérols : le  $\beta$ -sitostérol est majoritaire (90%) avec le campesterol (6%) et le stigmasterol (4%). Viennent ensuite les acides gras saturés (acides laurique, palmitique et stéarique) et insaturés (palmitoléique, oléique et linoléique) réparties à part égale (Girardi-Piva *et al.*, 2022). Enfin, la levure peut, en cas d'ajout d' $\text{O}_2$  pendant la fermentation, synthétiser de l'ergostérol (Parks., 1978). Selon les souches, les levures ont des besoins différents en oxygène au même titre que l'azote, cependant des quantités d'oxygène comprises entre 5 et 10 mg/L suffisent généralement au bon déroulement de la fermentation (Julien *et al.*, 2000). Le moment optimal pour effectuer un ajout se situe en fin de phase de croissance, soit au moment de l'obtention de la vitesse maximale de dégagement de  $\text{CO}_2$  (Blateyron and Sablayrolles., 2001).



#### ◇ Interaction entre l'azote assimilable et les lipides

La prise en compte conjointe de l'azote assimilable et de la teneur en lipides est un élément essentiel de la fermentation pour un pilotage optimal de celle-ci (Casalta *et al.*, 2013) avec deux situations courantes en oenologie : soit l'azote constitue le nutriment limitant, soit ce sont les lipides en cas de débordage excessif. Si l'azote n'est pas limitant, la turbidité (donc l'apport de lipides) doit être augmentée pour permettre l'assimilation de l'intégralité de l'azote assimilable. Si les lipides sont en trop faible quantité, on parle alors de stress lipidique et les fermentations seront languissantes avec une forte mortalité cellulaire (Casalta *et al.*, 2021).

#### ◇ Impact des lipides et de l'oxygène sur la fermentation

L'oxygène est un élément important qui participe à la viabilité cellulaire ainsi qu'à la synthèse lipidique. L'ajout d'oxygène permettra la synthèse d'ergostérol et en finalité d'améliorer la résistance membranaire à l'éthanol. Cet ajout permettra donc de lutter contre une carence lipidique, d'optimiser la consommation d'azote et de réduire le temps de fermentation (Ochando *et al.*, 2017) puisqu'indirectement l'oxygène joue sur la population et la viabilité cellulaire.

Lorsque de l'oxygène est apporté dans le milieu pendant la fermentation, il y a une inhibition de l'expression des gènes d'absorption des phytostérols par des facteurs de répression. A contrario et en absence d'oxygène la consommation des phytostérols présents est favorisée.

#### ◇ Relation entre nutriments et température sur la production d'arômes

Le vin est un produit complexe qui possède une structure aromatique puissante et dépendante de la présence de composés volatils dont les origines sont diverses (Lambrechts and Pretorius., 2000; Swiegers *et al.*, 2005). En effet, ces molécules aromatiques sont issues (i) du raisin, (ii) dans la fermentations alcoolique et malolactique ou (iii) produites lors du vieillissement. Les arômes fermentaires, aussi appelés « arômes secondaires », sont des molécules volatiles synthétisées par les microorganismes pendant les fermentations alcooliques et malolactique (Figure 5).

Ces arômes sont répartis en quatre catégories : alcools supérieurs, esters d'acétate, esters d'éthyle et acides gras volatils. La production des arômes fermentaires dépend de la souche de levure utilisée mais aussi de différents paramètres environnementaux tels que : la température, l'azote assimilable et les lipides (Pirou., 2022 ; Swiegers *et al.*, 2005).

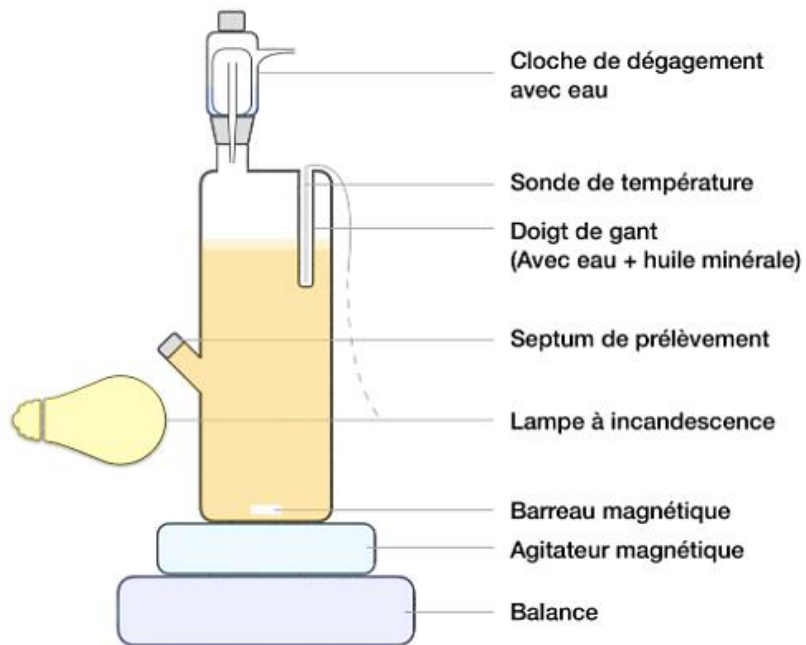


Figure 6- Schéma d'un montage de fermentation. (d'après Pirou.,2022)

## II. Matériels et méthodes

### Conditions de fermentation

Les fermentations ont été réalisées dans des fermenteurs cylindriques en verre de 1.2 L contenant 1 L de moût. Un barreau aimanté dans le fermenteur et un agitateur magnétique (150 rpm) permettent de garder le milieu homogène. Les fermenteurs sont surmontés d'une cloche remplie d'eau afin de permettre le dégagement de CO<sub>2</sub> tout en maintenant l'anaérobiose (Figure 6). Les fermenteurs sont placés sur des balances individuelles pour effectuer le suivi cinétique précis et automatique grâce à la mesure du dégagement de CO<sub>2</sub> par la perte de poids toutes les 20 minutes (Sablayrolles *et al.*, 1986). Placés dans une pièce climatisée (14 à 18 °C), les fermenteurs sont individuellement équipés d'une sonde mesurant la température dans la phase liquide au moyen d'un doigt de gant. Une lampe chauffante, placée sous le contrôle de la sonde thermique, s'allume ou s'éteint pour assurer le régime de température souhaité pour chaque poste de fermentation. Toutes les fermentations de nos essais ont été réalisées en conditions isothermes à 20 °C.

Les levures sèches actives (LSA2 et LSA3) sont inoculées dans les fermenteurs à 25 g/hL : elles sont préalablement réhydratées dans 30 mL d'eau du réseau pendant 20 minutes au bain à ultrasons pour disperser la phase solide puis pendant 20 minutes dans un agitateur/incubateur (INFORS, Bottmingen, SUISSE) à 37°C.

Les moûts de raisins de l'étude proviennent de l'Unité Expérimentale de Pech-Rouge (Gruissan, France). Après récolte des deux cépages (Sauvignon et Sauvignac en Vendée sur le vingoble des pépinières Mercier), les raisins ont été transportés et pressés à Pech Rouge. Les moûts obtenus sont clarifiés par sédimentation statique (24 heures, à froid) et les bourbes respectives sont récupérées séparément. Elles sont constituées de débris végétaux : pépins et rafle en majorité. Leur composition est la suivante : 76% de polysaccharides, 8% de lipides et environ 3% d'azote (Casalta *et al.*, 2013). Les moûts clairs disposent des caractéristiques œnologiques suivantes :

**Tableau 2** : Caractéristiques de moûts de Sauvignon et Sauvignac

	<i>Sucre totaux (g/L)</i>	<i>Acide Aminés (mg/L)</i>	<i>Azote ammoniacal (mg/L)</i>	<i>Azote assimilable (mg/L)</i>	<i>SO<sub>2</sub> totaux</i>	<i>Teneur en stérols totaux dans les bourbes (mg.gMS-1*)</i>
<i>Sauvignon</i>	207.9	58	58	116	2	6.65
<i>Sauvignac</i>	194.2	72	102	174	29	7.38

\*mg.gMS-1 : mg.g de Masse Sèche de bourbes

Pour chacun des moûts et afin de standardiser la nutrition azotée des levures, l'azote assimilable a été ajusté à 200 mg/L avec une solution de DAP (Diammonium Phosphate, à 20 g/L). Des ajouts de 1,3mL et de 4,2mL (pour 1 L de moût mis en œuvre) ont été faits respectivement dans les mouts Sauvignac et Sauvignon.

Tableau 3 - Plan de protocole des fermenteurs.

Mout	Levure	Nutrition lipidique	Code FA et échantillons
Sauvignon	LSA2	1% bourbes	SON-LSA2-1%+DAP
Sauvignon	LSA3	1% bourbes	SON-LSA3-1%+DAP
Sauvignac	LSA2	1% bourbes	SAC-LSA2-1%+DAP
Sauvignac	LSA3	1% bourbes	SAC-LSA3-1%+DAP
<b>-----</b>			
Mout	Levure	Nutrition lipidique	Code FA et échantillons
Sauvignon	LSA2	3% bourbes	SON-LSA2-3%+DAP
Sauvignon	LSA3	3% bourbes	SON-LSA3-3%+DAP
Sauvignac	LSA2	3% bourbes	SAC-LSA2-3%+DAP
Sauvignac	LSA3	3% bourbes	SAC-LSA3-3%+DAP
<b>-----</b>			
Mout	Levure	Nutrition lipidique	Code FA et échantillons
Sauvignon	LSA2	1% bourbes + PT4	SON-LSA2-1%+DAP+PT4
Sauvignon	LSA3	1% bourbes + PT4	SON-LSA3-1%+DAP+PT4
Sauvignac	LSA2	1% bourbes + PT4	SAC-LSA2-1%+DAP+PT4
Sauvignac	LSA3	1% bourbes + PT4	SAC-LSA3-1%+DAP+PT4
<b>-----</b>			
Mout	Levure	Nutrition lipidique	Code FA et échantillons
Sauvignon	LSA2	1% bourbes + O2 Vmax	SON-LSA2-1%+DAP+O2 Vmax
Sauvignon	LSA3	1% bourbes + O2 Vmax	SON-LSA3-1%+DAP+O2 Vmax
Sauvignac	LSA2	1% bourbes + O2 Vmax	SAC-LSA2-1%+DAP+O2 Vmax
Sauvignac	LSA3	1% bourbes + O2 Vmax	SAC-LSA3-1%+DAP+O2 Vmax

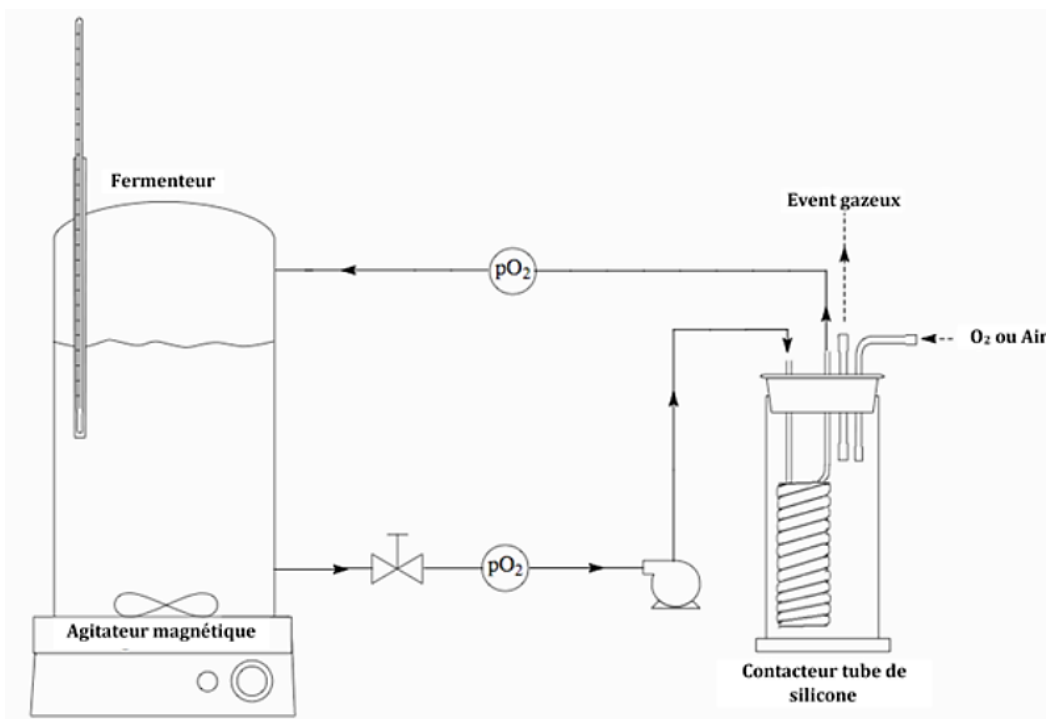


Figure 7 - Schéma du système d'apport de l'oxygène par diffusion en fermentation

Afin d'évaluer l'impact de la nutrition lipidique des levures en fermentation, 3 conditions opératoires (Tableau 3) sont réalisées :

- i. des quantités variables de bourbes (contenant notamment des phytostérols) sont ajoutées : pour ce faire, deux niveaux de bourbes ont été testés avec 1% et 3% ce qui correspond respectivement à 10 et 30 mL ajoutés. Chaque volume correspondant de moût est préalablement retiré du fermenteur pour être remplacé par les bourbes, les particules solides contenues dans les bourbes ayant été remises en suspension au moment de l'ajout.
- ii. un nutriment riche en lipides, PT4, a également été utilisé. Ce produit est fourni par la société Lallemand Œnologie (Toulouse, France) pour être testé est introduit à la dose de 30g/hL lors de la phase de réhydratation des levures.
- iii. un ajout d'O<sub>2</sub> à la V<sub>max</sub> pour induire la synthèse de l'ergostérol par les levures pendant la fermentation. Développé au laboratoire, le système d'apport d'oxygène (Figure 7) utilisé permet d'effectuer des additions précises par diffusion à travers la membrane d'un tube de silicone avec des vitesses de transfert et des quantités transférées modulables et parfaitement contrôlées (Moenne *et al.*, 2013). Ainsi, 10 mg d'O<sub>2</sub> par litre de moût sont ainsi apportés pendant 1h30.

Durant la fermentation, trois prises d'échantillons ont été effectuées : la première (12 heures après l'inoculum de levures) pour le comptage de la population cellulaire totale, la deuxième (à 80% d'avancée de la fermentation) pour la viabilité des cellules et la troisième à la fin de la fermentation pour quantifier les métabolites du métabolisme carboné central (MCC), les composés volatils et les thiols.

### **Population cellulaire et viabilité**

Au début de la fermentation, la concentration de la population cellulaire totale a été déterminée par le compteur Beckman Coulter (Modèle Z2, Beckman-Coulter, Margency, France) équipé d'une sonde avec un orifice de 100 µm d'ouverture par lequel passent les cellules. Le passage des cellules non-conductrices dans la zone de détection va entraîner un changement de résistance électrique. Une dilution adaptée (1/20<sup>ème</sup>) avec un électrolyte (Isoton II<sup>®</sup>, Beckman Coulter) est réalisée pour avoir une concentration située dans la gamme de mesure de l'appareil et une étape de sonication (30s, 10W) préalable à la mesure a été effectuée pour disperser les éventuels agrégats.

A 80% de l'avancement de la fermentation, un prélèvement a été effectué pour mesurer la viabilité des cellules par cytométrie en flux à l'aide d'un cytomètre Attune, ThermoFisher<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). 1 ml d'échantillon a été centrifugé (3 min à 4500 rpm, 4 °C) et les cellules ont été remises en suspension dans le même volume de PBS (130 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4). Une dilution au 200<sup>ème</sup> a été réalisé et 2 µl d'iodure de propidium (solution à 0,1 mg/ml conservée à 4 °C à l'abri de la lumière ; Calbiochem) ont été ajoutés à 20 µl d'échantillon pour la suspension cellulaire. Les échantillons ont été mélangés par agitation douce et l'analyse par cytométrie de flux à l'iodure de propidium (PI) a été réalisée 10 min après la coloration.



## Détermination des composés du métabolisme carboné central (MCC)

Les concentrations des composés du MCC : en éthanol, glycérol, succinate, alpha-cétoglutarate et acétate ont été déterminées par HPLC (HPLC 1260 Infinity, Agilent™ Technologies, Santa Clara, Californie) sur une colonne Phenomenex Rezex ROA (Phenomenex™, Le Pecq, France) à 60 °C. L'échantillon est centrifugé 5 min à 2000 rpm, puis dilué au 1/6<sup>ème</sup> avec une solution d'acide sulfurique à 0.005 N, qui sert aussi de phase mobile (débit de 0,6 mL/min). Les acides organiques ont été analysés avec un détecteur UV (Agilent™ Technologies, Santa Clara, Californie) à 210 nm ; les concentrations des autres composés ont été quantifiées avec un détecteur à indice de réfraction (Agilent™ Technologies, Santa Clara, Californie). Les analyses ont été réalisées avec le logiciel Agilent™ ChemStation (Santa Clara, Californie).

## Quantification des arômes fermentaires

10 µL d'une solution d'étalons deutérés (contenant le butanoate d'éthyle-d5, l'hexanoate d'éthyle-d5, l'octanoate d'éthyle-d5, l'acide butyrique-d7, le décanoate d'éthyle-d5, le phényléthanol-d4) à 100 pg/mL chacun sont ajoutés à 5 mL d'échantillon dans un tube en pyrex de 15 mL bouché avec un bouchon en téflon (Supelco, Bellefonte, Pennsylvanie, États-Unis). L'échantillon est extrait 2 fois avec 1 mL de dichlorométhane pendant 20 minutes sous agitation douce sur une table agitante. L'échantillon est ensuite centrifugé pendant 5 minutes à 3000 rpm à 4 °C. La phase organique est alors récupérée dans un tube de 4 mL et séchée avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre en quantité suffisante pour éliminer toute trace d'eau. 1,2 mL de la phase organique sont transférés dans un tube de 1,5 mL et concentrés sous flux d'azote jusqu'à un volume final de 0,5 mL. L'échantillon est enfin transféré dans un insert pour injection en chromatographie phase gazeuse (Supelco, Bellefonte, Pennsylvanie, États-Unis), placé lui-même dans un vial scellé. Les concentrations des composés volatils jouant un rôle dans la formation d'arômes ont été mesurés par chromatographie en phase gazeuse Hewlett Packard (Agilent™ Technologies, Santa Clara, CA, USA) 6890 équipé d'un passeur d'échantillons CTC Combi PAL AOC5000 (Shimadzu™, Columbia, USA) et couplé à un détecteur de spectrométrie de masse Hewlett Packard 5973 (Agilent™ Technologies, Santa Clara, CA, USA). Le contrôle de l'instrument et l'analyse des données sont effectués avec le logiciel HP G1701DA ChemStation (Agilent™ Technologies, Santa Clara, CA, USA). L'hélium est utilisé comme gaz vecteur avec une vitesse linéaire de 36 cm/s et un débit de 1,0 mL/min en mode débit constant. L'injecteur et la ligne de transfert sont chauffés à 250°C. Le volume d'injection est de 2µL. L'échantillon est injecté en mode splitless, avec une division de 10 mL/min et un temps de splitless de 30 secondes. La température du spectromètre de masse est de 150°C et celle de la source est de 230°C, la ligne de transfert est quant à elle maintenue à 250°C. Pour la quantification, les spectres de masse ont été enregistrés en mode SIM (Selected Ion Monitoring) avec impact électronique d'ions positifs à 70eV. Pour l'identification, divers paramètres sont utilisés tels que l'ion de quantification et les ions confirmation ainsi que le temps de rétention.

## Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R version 4.2.3. Une analyse par composante principale (ACP) a été réalisée avec les packages FactoMineR et tidyverse. Des tests Tukey ont été fait afin de tester des hypothèses expérimentales via les packages tidyverse et Hmisc.

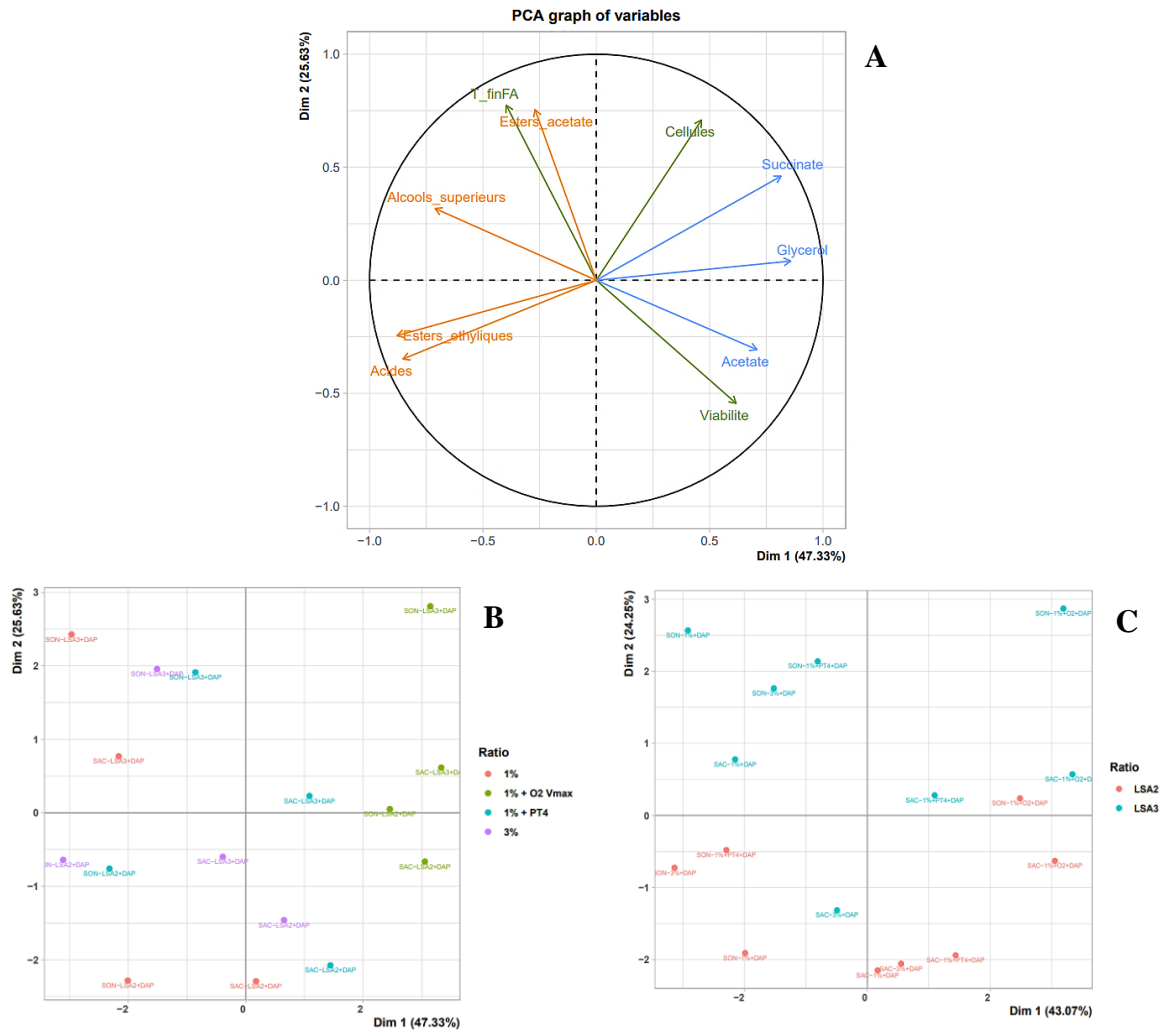


Figure 8-A : **Analyse en composante principale (ACP)** : T\_finFA = durée pour obtenir 90g.L<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> dégagé, Viabilité = viabilité cellulaire, Cellules = population cellulaire, Glycerol, Acetate et Succinate = concentrations en métabolites du métabolisme carboné central, Acides, Esters\_ethyliques, Esters\_acetate et Alcools\_superieurs = concentrations en arômes fermentaires considérés en somme par famille.

Figure 8-B : **Répartition des individus représentés selon les conditions de fermentation** (1% ou 3% de bourbes ajoutés, 1% de bourbes + ajout de PT4 et 1% de bourbes + ajout d'O<sub>2</sub> à la V<sub>max</sub>).

Figure 8-C : **Répartition des individus représentés selon la levure utilisée** (LSA2 ou LSA3). Abréviation : LSA : Levure sèche active.

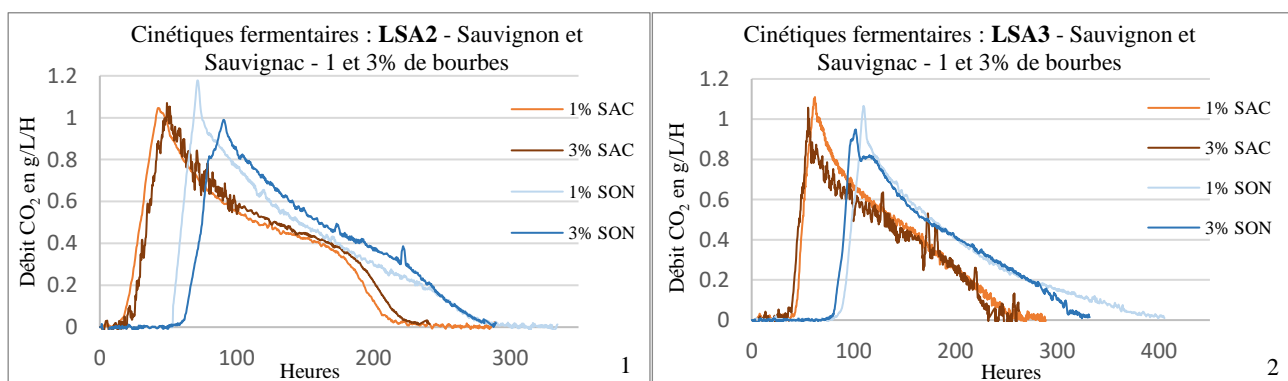


Figure 9- Cinétiques fermentaires des levures 2 (1) et 3 (2) dans les moûts Sauvignon et Sauvignac avec les conditions d'ajout de 1 et 3% de bourbes. Abréviations : LSA (levures sèches actives), SAC (Sauvignac) et SON (Sauvignon).

### III. Résultats

#### ACP générale

L'analyse en composante principale permet d'observer les corrélations entre les différentes variables (Figure 8, A) et de visualiser la répartition des individus en fonction soit des conditions de fermentation (Figure 8, B) soit de la levure utilisée (Figure 8, C).

L'axe 1 (Figure 8, B) semble être porté par la condition « 1% + O<sub>2</sub> V<sub>max</sub> » tandis que l'axe 2 (Figure 8, C) semble être porté par la levure LSA2 ou LSA3. Ces premières observations montrent que l'ajout d'oxygène à la V<sub>max</sub> joue un rôle prépondérant dans les métabolites du métabolisme carboné central (MCC) puisque ces derniers sont corrélés positivement avec cette modalité de fermentation. A contrario, l'ajout d'O<sub>2</sub> est négativement corrélé aux concentrations en acides et en esters éthyliques. Les autres conditions ne semblent pas avoir d'effets impactant sur les composés post-fermentation avec une dispersion des individus dans les différentes conditions de nutrition lipidique.

Par ailleurs, l'ACP montre que la viabilité et la durée de fermentation sont anti-corrélées ce qui signifie que plus la viabilité cellulaire est élevée, plus la fermentation s'achève rapidement. Les concentrations finales en glycérol et succinate sont corrélés positivement entre elles tandis que ces deux métabolites sont anti-corrélés avec les acides et esters éthyliques. En ce qui concerne les arômes, les acides et les esters éthyliques sont positivement corrélés.

#### Cinétiques de fermentation

Les cépages se différencient aux niveaux des cinétiques de fermentation (Figure 9). Le Sauvignac induit une phase de latence d'environ 50h contre 100h pour le Sauvignon. Le temps de fermentation est aussi impacté avec en moyenne 240h et 300h pour le Sauvignac et le Sauvignon respectivement. Toutefois, si on normalise les cinétiques fermentaires en faisant abstraction des phases de latence, on constate que les temps de fermentations sont très proches pour un même type de moût avec les deux levures employées.

Enfin, de façon générale, on constate que les vitesses maximales de fermentation et les viabilités des différents essais sont assez proches ce qui indique qu'il y a peu de différences dans les sources de lipides ajoutées, la nutrition azotée ayant été standardisée dans toutes les modalités. Une nuance peut toutefois être apportée pour la viabilité (Annexe 1) significativement différente avec la levure LSA3 dans le Sauvignac : elle s'établit à environ 70% contre 75 à 80% pour les autres associations moûts / LSA.

Enfin, la condition « 1% + O<sub>2</sub> » montre systématiquement une augmentation du pourcentage de cellules vivantes à plus de 80% pour les deux levures, dans le Sauvignac comme dans le Sauvignon. Cette même condition montre une réduction du temps de fermentation d'environ 50h (données non présentées).

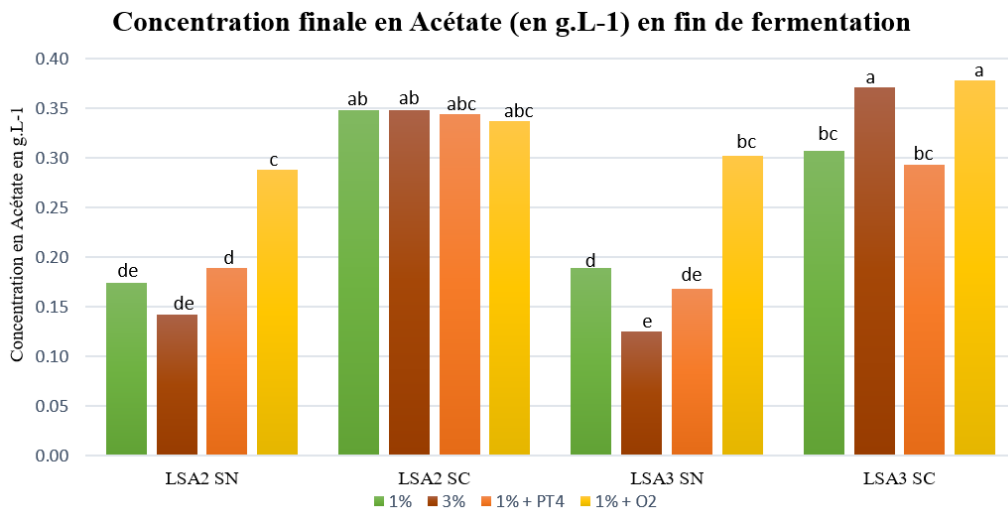


Figure 10- Concentrations (g.L<sup>-1</sup>) finales en Acétate en fin de fermentation, dosage fait par HPLC. Les résultats du test statistique de Tukey sont représentés sous la forme de lettres minuscules. Abréviations : LSA (levures sèches actives), SN (Sauvignon), SC (Sauvignac), 1%/ 3%/ 1%+PT4/ 1%+O<sub>2</sub> (correspond aux conditions de fermentation avec ajout de bourbes, de PT4 ou d'oxygène).

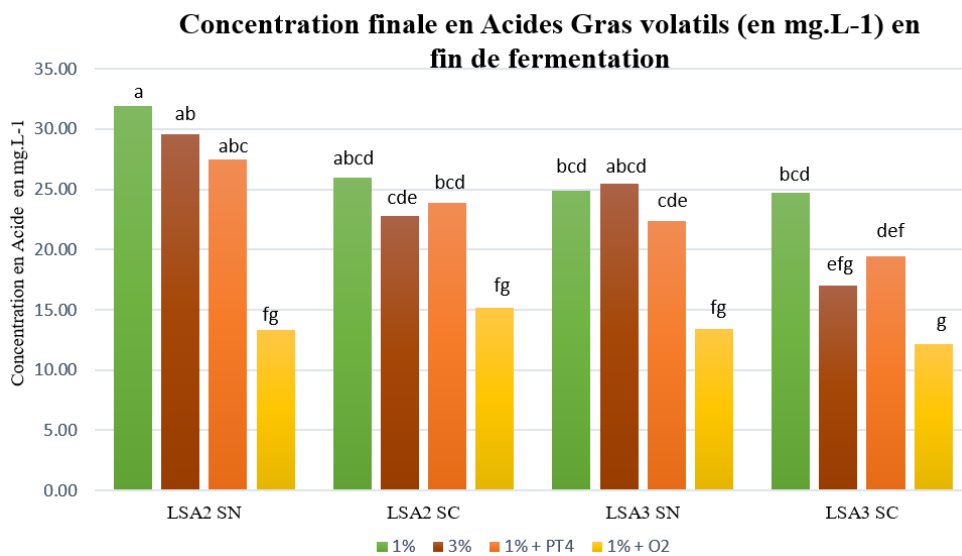


Figure 11- Concentrations (g.L<sup>-1</sup>) finales en Acides Gras volatils en fin de fermentation, dosage fait en LC-MS. Ces résultats du test statistique de Tukey sont représentés sous la forme de lettres minuscules. Abréviations : LSA (levures sèches actives), SN (Sauvignon), SC (Sauvignac), 1%/ 3%/ 1%+PT4/ 1%+O<sub>2</sub> (correspond aux conditions de fermentation avec ajout de bourbes, de PT4 ou d'oxygène).

## Métabolisme carboné central

Comme vu précédemment, les concentrations finales en glycérol et succinate sont corrélées positivement. Ces deux métabolites sont en effet reliés par l'oxydoréduction du  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ . Les concentrations en glycérol (Annexe 2, A) et en succinate (Annexe 2, B) sont similaires entre les différentes associations moûts / LSA pour les conditions de fermentation « 1% » et « 3% » de bourbes et « 1% + PT4 ». Pour le glycérol comme pour le succinate, l'apport d'oxygène après la  $V_{\text{max}}$  impacte positivement et de façon significative leurs concentrations, quelle que soit l'association moût / LSA.

L'effet de l'oxygène se retrouve aussi pour la concentration en acétate (Figure 10), de façon d'autant plus notable pour le moût Sauvignon que pour le Sauvignac. En effet, une différence de concentration est observable entre les deux moûts et ce même sur la condition témoin « 1% de bourbes ». La concentration est doublée entre les deux variétés. Cela signifie que la composition du moût semble impacter la synthèse d'acétate.

## Arômes fermentaires

D'après l'ACP, une corrélation positive existe entre la concentration en acides gras volatils (Figure 11) et celle en esters éthyliques (Annexe 3, A), en lien avec une réaction d'élongation d'un acyl-CoA (précurseurs des acides gras volatils et des esters d'éthyles). Une différence significative est toutefois observable pour ces deux types d'arômes qui voient leurs concentrations diminuer drastiquement dans la modalité ajout d'oxygène. Pour les autres conditions, il n'y a pas de tendance spécifique quelle que soit l'association moût / levure.

De la même façon, une corrélation positive est observable entre les alcools supérieurs et les esters d'acétates, il s'agit ici aussi d'une réaction d'estérification des alcools en esters. Pour la concentration en alcools supérieurs (Annexe 3, B), il n'y a pas de tendance entre les différentes conditions ni entre les associations moût / LSA.

Pour les esters d'acétate, une différence significative distingue les deux levures. La synthèse de ces arômes semble être levure dépendante. Néanmoins il n'y a pas de différences entre les conditions pour la LSA2 tandis que pour LSA3 les concentrations sont plus variables, avec notamment une baisse de la concentration pour les conditions « 3% de bourbes » et « 1% +  $\text{O}_2$  ».



#### IV. Discussion

L'ensemble des résultats permet de relever certains points de discussion intéressants, notamment sur les paramètres cinétiques ou encore sur la variation de l'acétate en fonction de la levure utilisée, d'autant plus que l'acétate est un paramètre de défaut dans le vin. Ces 2 points seront abordés en premier.

Néanmoins, le principal résultat de ce travail est la mise en évidence du rôle clé de l'ajout d'oxygène sur les différentes synthèses métaboliques. Cet ajout a un effet sur l'ensemble des paramètres mesurés, son rôle sera donc décrit en détails.

#### Impact des sucres sur la viabilité et temps de fermentation

Durant la fermentation, la viabilité cellulaire est impactée par la quantité d'éthanol présente dans le milieu. La concentration en éthanol dépend de la quantité de sucres initialement présente dans le milieu suivant la réaction  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$ . Par conséquent, plus il y a de sucres dans le moût et plus la quantité en éthanol sera importante, générant un stress conséquent pour la levure. Pour pallier à ce stress et augmenter la résistance à l'éthanol, les lipides ont toute leur importance : ils permettent de maintenir l'intégrité de la membrane de *S. cerevisiae* et sa fluidité. La comparaison de nos essais avec ceux de la précédente étudiante, Lisa Pirou, sur la vendange 2021 illustre parfaitement ce phénomène (Tableau 4).

*Tableau 4-* Exemple de comparaison sur le moût Sauvignac pour les vendanges 2021 et 2022

<i>Sauvignac</i>	Sucres (g.L <sup>-1</sup> )	TAV* (% V/V)	<i>Temps de FA (h)</i>		<i>Viabilité cellulaire (%)</i>	
			LSA2 + 3% de bourbes	LSA3 + 1% de bourbes	LSA2 + 1% de bourbes	LSA3 + 1% de bourbes
<i>Vendange 2021</i>	242	14,5	261	594	62,7	7,31
<i>Vendange 2022</i>	194	11,5	155	172	78,8	69,98

\*TAV : Titre Alcoométrique Volumique : proportion d'éthanol exprimée en pourcentage en volumique.

\*FA : Fermentation alcoolique

Le plus fort taux de sucre en 2021 explique la plus forte teneur en éthanol par rapport à 2022. A quantités de bourbes identiques et avec les mêmes levures employés pour les deux millésimes, le fait que la viabilité ait été nettement plus faible pour la vendange 2021 qu'en 2022 semble majoritairement lié à un « stress éthanol » plus élevé en 2021. Cette constatation apparaît également comme l'une des explications pour justifier les différences de cinétiques observées entre les deux millésimes, avec des temps de fermentation nettement plus longs en 2021.

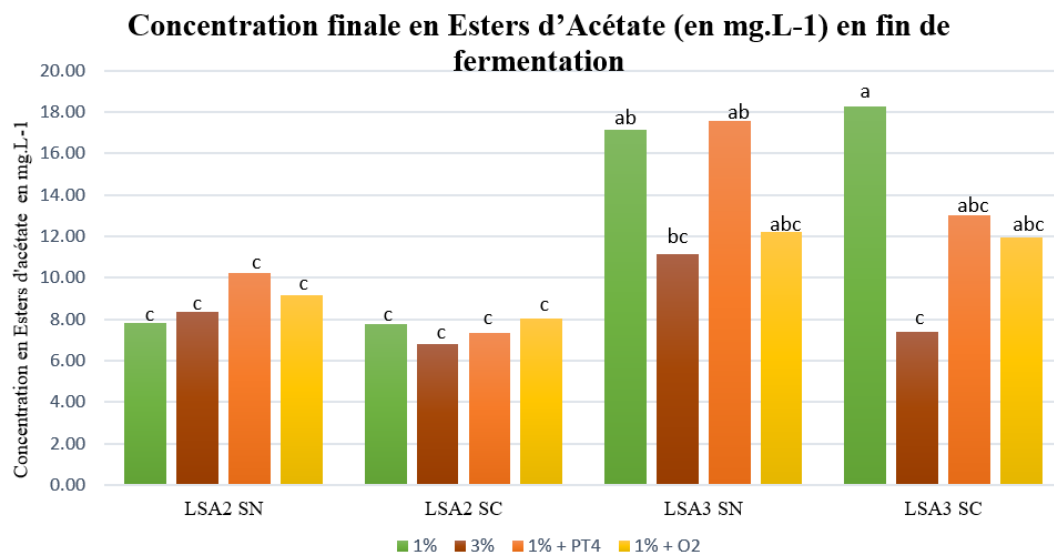


Figure 12- Concentrations (g.L<sup>-1</sup>) finales en Esters d'Acétate en fin de fermentation, dosage fait en LC-MS. Ces résultats du test statistique de Tukey sont représentés sous la forme de lettres minuscules. Abréviations : LSA (levures sèches actives), SN (Sauvignon), SC (Sauvignac), 1%/ 3%/ 1%+PT4/ 1%+O<sub>2</sub> (correspond aux conditions de fermentation avec ajout de bourbes, de PT4 ou d'oxygène).

## **Impact des conditions de fermentation sur la concentration en acétate**

Les résultats montrent que la concentration en acétate (Figure 12) est moût dépendante avec des teneurs finales plus importantes pour le Sauvignac comparé au Sauvignon. Les données disponibles dans la littérature démontrent qu'il y a normalement une augmentation d'acétate en présence d'une plus faible concentration en lipides (Rollero *et al.*, 2015, Ochando *et al.*, 2016). En conditions d'anaérobiose stricte, les stérols et les acides gras ne peuvent être produits par la levure car leur synthèse nécessite obligatoirement de l'oxygène. La levure utilise dans ce cas les lipides disponibles dans le milieu, en lien avec les bourbes présentes. Sur ce point, les teneurs en lipides des bourbes de Sauvignac et de Sauvignon sont différentes avec 6.65 mg.gMS<sup>-1</sup> et 7.38 mg.gMS<sup>-1</sup> respectivement. Ceci veut dire qu'à pourcentage de bourbes utilisées identique, le Sauvignac est plus riche en lipides que le Sauvignon. En ce sens, nos résultats sont contradictoires avec la littérature. Cette observation indique que, dans notre étude, les lipides ne sont pas les nutriments responsables de la production différente d'acétate dans les 2 moûts.

Une hypothèse possible pour expliquer la différence de production d'acétate entre les 2 moûts est la concentration initiale en SO<sub>2</sub>. En effet, le SO<sub>2</sub> étant toxique pour la levure, son mécanisme de résistance consiste à surproduire de l'acétaldéhyde pour complexer le SO<sub>2</sub>. Cette surproduction est liée à l'inhibition de l'alcool déshydrogénase limitant l'utilisation de l'acétaldéhyde par la levure. En présence de SO<sub>2</sub>, il y a donc plus d'acétaldéhyde, qui est un intermédiaire à la synthèse d'acétate. (Ochando *et al.*, 2020).

## **L'influence de l'oxygène sur la synthèse des métabolites du MCC**

Sur l'ACP générale présentée dans la partie résultats, les individus ayant comme condition « 1% + O<sub>2</sub> » sont portés par l'axe 1 et sont donc expliqués par les métabolites du MCC. Ceci signifie que l'ajout d'oxygène a un effet majeur sur la synthèse de ces composés.

Dans la littérature, après ajout d'O<sub>2</sub>, la levure synthétise majoritairement de l'ergostérol mais aussi des acides gras (Parks., 1978). Ces lipides sont synthétisés *via* la voie de l'acétyl-CoA, faisant intervenir la pyruvate déshydrogénase (PDH). Dans les modalités ayant reçu un ajout d'oxygène à la V<sub>max</sub>, il y a vraisemblablement une augmentation du flux de pyruvate permettant de produire une plus forte quantité d'acétyl-CoA cytosolique nécessaire à la synthèse lipidique. Un des intermédiaires de cette voie étant l'acétate, l'augmentation de sa production constatée dans les modalités oxygénées apparaît donc conforme à la bibliographie (Deroite *et al.*, 2018). Si on considère le même moût, les levures produisent des niveaux d'acétate assez proches. Les deux levures utilisées semblent donc avoir la même capacité métabolique de synthèse d'acétate.

Par ailleurs, l'ajout d'oxygène entraîne également une augmentation de la synthèse de l'acide succinique via la branche oxydative du cycle de krebs ce qui conduit à la production de NADH qui sera par la suite réoxydé principalement par la réaction permettant d'obtenir le glycérol (Rollero *et al.*, 2015). Sur cette même ACP, le glycérol et le succinate sont corrélés positivement, sachant que la levure doit maintenir un équilibre pour respecter les contraintes redox, ce résultat semble alors cohérent.



## **L'ajout d'oxygène entraîne une diminution de la synthèse des esters d'acétate**

Lors de cette présente étude, les résultats obtenus montrent que les deux levures ont des réactions différentes vis-à-vis de l'ajout d'oxygène, en termes de production d'arômes fermentaires. Pour la levure LSA2 il n'y a pas de différence de synthèse des esters d'acétate entre les 4 conditions fermentaires et l'on observe par contre pour LSA3 une diminution de cette concentration avec apport de bourbes (conditions 3%) et avec ajout d'oxygène. On parle alors d'effet souche sur la synthèse des arômes, cet effet venant des variations des voies métaboliques propres à chaque souche (Guittin *et al.*, 2022, Girardi *et al.*, 2022).

Au vu de ces résultats, il serait intéressant de faire une analyse génomique afin de comparer, entre les deux souches, les taux d'expression du gène ATF1 qui est le gène clé de la réaction liant les alcools supérieurs et les esters d'acétate (codant pour une Alcool Acetyl Transferase). L'hypothèse pourrait être que l'expression du gène pour LSA2 serait plus faible que pour LSA3.

Les résultats obtenus pour la souche LSA3 permettent de poser une hypothèse. En effet, l'expression du gène ATF1 est réprimée par la présence de lipides mais également par l'ajout d'oxygène, ceci a pour impact une diminution de la conversion des alcools supérieurs en esters d'acétate. (Fujii *et al.*, 1997)

## **L'ajout d'oxygène est responsable d'une diminution significative de la synthèse des esters d'éthyle et des acides gras volatils**

Les résultats obtenus démontrent un effet significatif de l'oxygène sur la synthèse des acides gras volatils ainsi que des esters d'éthyle. Pour ces 2 familles chimiques de molécules, l'ajout d'O<sub>2</sub> entraîne une forte baisse de production.

Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le transfert des esters d'éthyles de l'intérieur de la cellule vers le milieu extracellulaire dépend de leurs compositions (il diminue avec l'augmentation de la longueur de leur chaîne carbonée). Le taux de formation des esters dépend de la concentration en co-substrat (-CoA et alcool), de l'activité enzymatique et de leur hydrolyse. Les esters d'éthyles sont donc le produit d'une réaction de condensation entre acyl-CoA et éthanol.

Or en présence d'O<sub>2</sub>, l'inhibition de l'acétyl-CoA carboxylase est levée ce qui entraîne une élongation des acyl-CoA en acides gras à longue chaîne (ceci rend leur transfert vers le milieu extérieur plus difficile donc entraîne une baisse de la concentration finale dans le vin). Les acyl-CoA étant moins présents et étant un intermédiaire des esters éthyliques, leurs synthèses est alors diminuée (Saerens *et al.*, 2009).



## V. Conclusion

En comparaison avec les caractéristiques du mout de l'année dernière, les vendanges 2022 semblent avoir des caractéristiques plus favorables pour la levure. Les raisins ont une maturité plus faible ce qui signifie que la concentration en sucre est plus faible donc moins d'éthanol est synthétisé, le stress pour la levure est alors plus faible. La teneur en lipides étant plus élevée, la résistance membranaire est également plus élevée. Ces conditions permettent un bon développement de la levure sans apport complémentaire de lipides. Ainsi, pour le millésime 2022, les résultats obtenus indiquent qu'il n'y a pas d'effet de l'ajout des bourbes, ni de PT4. L'ajout d'oxygène est le seul à avoir un impact ; il conduit à une hausse de la viabilité cellulaire et une réduction du temps de fermentation mais entraîne une diminution de la concentration en arômes.

Le but étant de comparer l'efficacité des apports lipidiques, il pourrait être intéressant, de re-tester le protocole expérimental avec des mouts présentant des caractéristiques plus stressantes pour la levure (notamment une teneur en sucre plus élevée).

Néanmoins, le mout Sauvignon et le mout Sauvignac réagissent généralement de la même façon. Le Sauvignac est une variété résistante au mildiou mais il semblerait que cette résistance n'impacte pas les propriétés organoleptiques du vin.



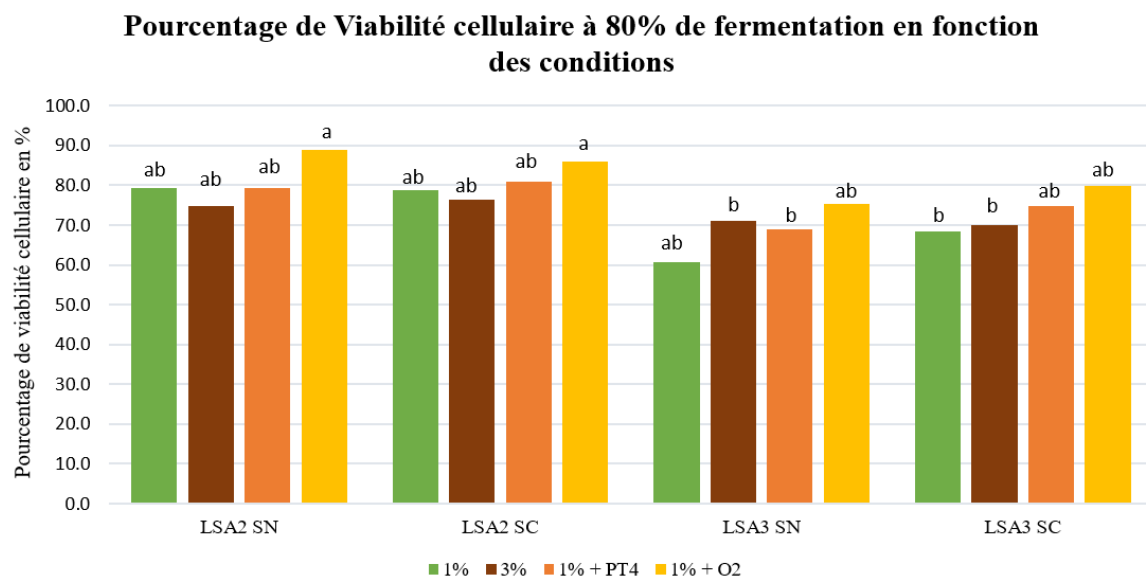
## Bibliographie

- Blateyron, L., et Sablayrolles, J.-M. 2001. Stuck and Slow Fermentations in Enology : Statistical Study of Causes and Effectiveness of Combined Additions of Oxygen and Diammonium Phosphate. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91 (2) : 184-89. DOI: 10.1263/jbb.91.184
- Casalta, E., Cervi, M. f., Salmon, J. m., Sablayrolles, J. m., 2013. White wine fermentation: interaction of assimilable nitrogen and grape solids. *Aust. J. Grape Wine Res.* 19, 47–52. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2012.00205.x>
- Casalta, E., Mouret, J.-R., Sablayrolles, J.-M., 2021. Le controle de la fermentation alcoolique en conditions oenologiques. *Rev. Oenologiques.*
- Casalta, E., Vernhet, A., Sablayrolles, J.-M., Tesniere, C., Salmon, J.-M., 2015. Review: Characterization and Role of Grape Solids during Alcoholic Fermentation under Enological Conditions. *Am. J. Enol. Vitic.* <https://doi.org/10.5344/ajev.2015.15060>
- Eldarov, M.A., Kishkovskaia, S.A., Tanaschuk, T.N., Mardanov, A.V., 2016. Genomics and biochemistry of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *Biochem. Mosc.* 81, 1650–1668. <https://doi.org/10.1134/S0006297916130046>
- Girardi-Piva, G., Casalta, E., Legras, J.-L., Nidelet, T., Pradal, M., Macna, F., Ferreira, D., Ortiz-Julien, A., Tesnière, C., Galeote, V., Mouret, J.-R., 2022. Influence of ergosterol and phytosterols on wine alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Front. Microbiol.* 13.
- Guitin, C., Maçna, F., Isabelle, S., Poitou, X., Sablayrolles, J.-M., Mouret, J.-R., Farines, V., 2021. Impact of high lipid contents on the production of fermentative aromas during white wine fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11479-5>
- Guitin, C., Maçna, F., Barreau, A., Poitou, X., Sablayrolles, J.-M., Mouret, J.-R., Farines, V., 2022. The aromatic profile of wine distillates from Ugni blanc grape musts is influenced by the nitrogen nutrition (organic vs. inorganic) of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 111, 104193. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104193>
- Julien. A., Roustan. J.-L., Dulau. L., Sablayrolles. J.-M. 2000. Comparaison of Nitrogen and Oxygen Demands of Enological Yeasts: Technological Consequences. *American Journal of Enology and Viticulture* 51 (3) : 215.
- Lambrechts, M.G and Pretorius, J.S. 2000. Yeast and its Importance to Wine Aroma. 21 : 97-129. DOI:10.21548/21-1-3560
- Malina, C., Yu, <https://orcid.org/0000-0001-7855-5311>, Rosemary, Björkeröth, <https://orcid.org/0000-0001-9901-4055>, Johan, Kerkhoven, E.J., Nielsen, J., 2021. Adaptations in metabolism and protein translation give rise to the Crabtree effect in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 118, e2112836118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2112836118>
- Moenne, M.I., Mouret, J.R., Sablayrolles, J.M., Agosin, E., Farines, V. 2013. Control of bubble-free oxygenation with silicone tubing during alcoholic fermentation. *Process Biochemistry*, 48(10), 1453 – 146. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.033>
- Ochando, T., Mouret, J.-R., Humbert-Goffard, A., Sablayrolles, J.-M., Farines, V., 2017. Impact of initial lipid content and oxygen supply on alcoholic fermentation in champagne-like musts. *Food Res. Int., MACROWINE 2016 Conference – Macromolecules and Secondary Metabolites of Grapevine and Wine* 98, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.010>
- Ochando, T., Mouret, J.-R., Humbert-Goffard, A., Aguera, E., Sablayrolles, J.-M., Farines, V., 2020. Comprehensive study of the dynamic interaction between SO<sub>2</sub> and acetaldehyde during alcoholic fermentation. *Food Res. Int.* 136, 109607. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109607>

- Parks, L.W. 1978. Metabolism of Sterols in Yeast. *CRC Critical Reviews in Microbiology* 6 (4) : 301-41. DOI: 10.3109/10408417809090625
- Pirou,L., 2022. Adaptation des itinéraires de vinification en fermentation. Rapport de stage de M2 IMHE
- Rollero, S., 2015. Impact des paramètres environnementaux sur la synthèse des arômes fermentaires par *Saccharomyces cerevisiae* en fermentation oenologique (phdthesis). Montpellier SupAgro.
- Sablayrolles. J.-M., et Barre. P. 1986. Evaluation des besoins en oxygène de fermentations alcooliques en conditions œnologiques simulées. *Sciences des aliments* 6 (n°3) : 373-83.
- Saerens, S.M.G., Delvaux, F.R., Verstrepen, K.J., Thevelein, J.M., 2010. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Biotechnol.* 3, 165–177. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00106.x>
- Schneider, C.J., Onimus, C., Prado, E., Dumas, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Dorne, M.A., Lacombe, M.C., Piron, M.C., Umar-Faruk, A., Duchêne, E., Mestre, P., Merdinoglu, D., 2019. INRA-ResDur: the French grapevine breeding programme for durable resistance to downy and powdery mildew. *Acta Hortic.* 207–214. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1248.30>
- Seguinot, P., 2019. Vers une meilleure exploitation du potentiel enzymatique et métabolique de *Metschnikowia pulcherrima* et *Torulaspota delbrueckii* pour la production d’arômes en fermentation oenologique (Theses). Université de Montpellier.
- Swiegers, J. h., Bartowsky, E. j., Henschke, P. a., Pretorius, I. s., 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 139–173. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>
- Wingerter, C., Eisenmann, B., Weber, P., Dry, I., Bogs, J., 2021. Grapevine Rpv3-, Rpv10- and Rpv12-mediated defense responses against *Plasmopara viticola* and the impact of their deployment on fungicide use in viticulture. *BMC Plant Biol.* 21, 470. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03228-7>

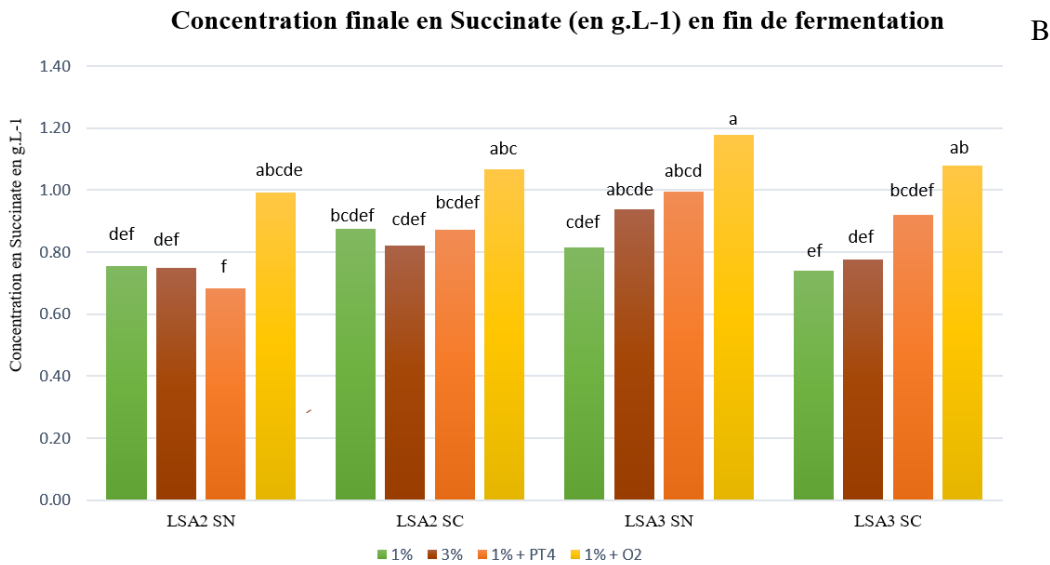
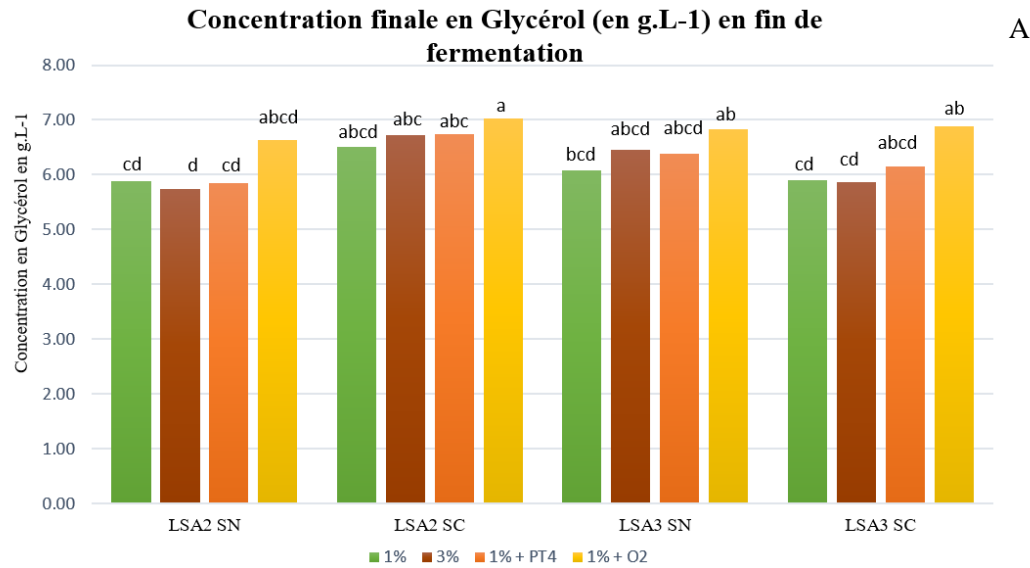
# ANNEXES

## ANNEXE 1- Viabilité cellulaire à 80% de fermentation



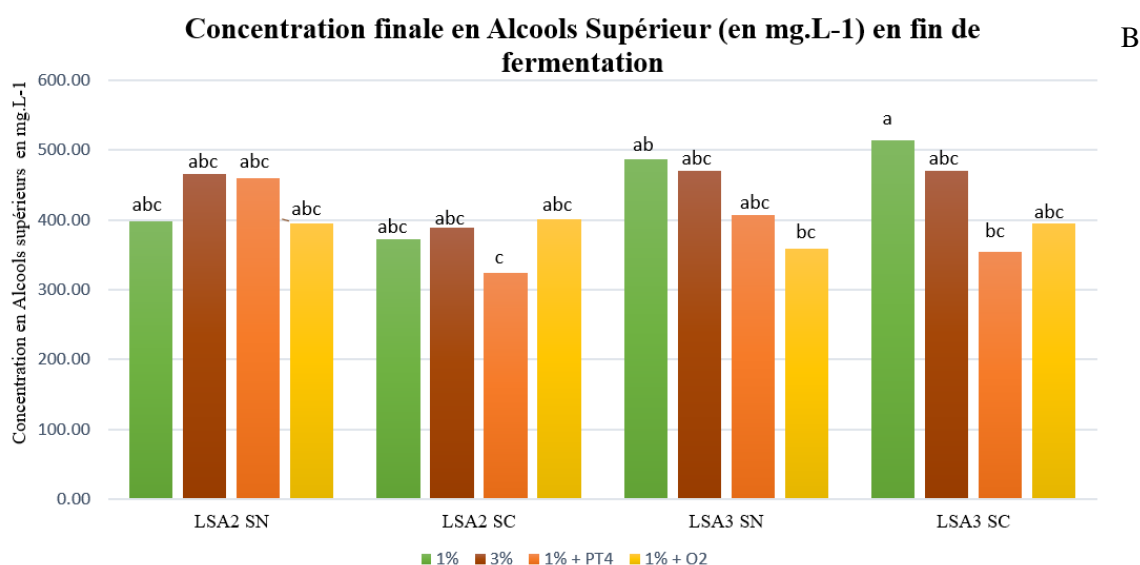
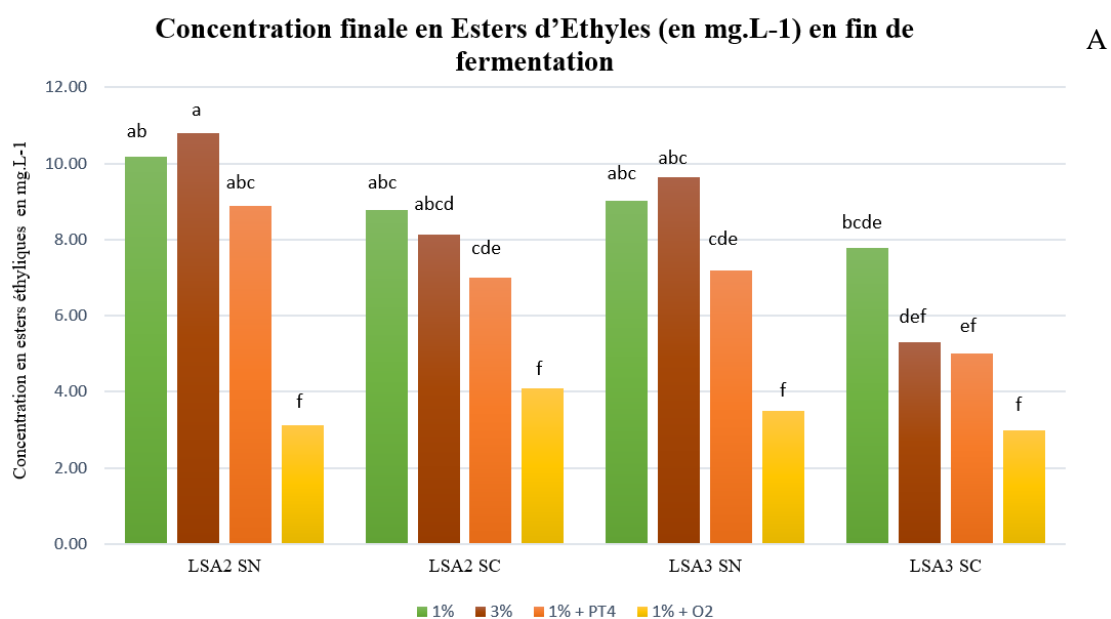
Annexe 1- Concentrations ( $\text{g.L}^{-1}$ ) finales en Glycérol (A), en Succinate (B) en fin de fermentation, dosage fait par HPLC. Les résultats du test statistique de Tukey sont représentés sous la forme de lettres minuscules. Abréviations : LSA (levures sèches actives), SN (Sauvignon), SC (Sauvignac), 1%/ 3%/ 1%+PT4/ 1%+O2 (correspond aux conditions de fermentation avec ajout de bourbes, de PT4 ou d'oxygène).

## ANNEXE 2 – Concentration finale en Glycérol et Succinate



Annexe 2- Concentrations (g.L<sup>-1</sup>) finales en Glycérol (A), en Succinate (B) en fin de fermentation, dosage fait par HPLC. Les résultats du test statistique de Tukey sont représentés sous la forme de lettres minuscules. Abréviations : LSA (levures sèches actives), SN (Sauvignon), SC (Sauvignac), 1%/ 3%/ 1%+PT4/ 1%+O2 (correspond aux conditions de fermentation avec ajout de bourbes, de PT4 ou d'oxygène).

**ANNEXE 3 – Concentration finale en Esters d’Ethyles, Alcools Supérieur et Esters d’Acétate**



Annexe 3- Concentrations (g.L<sup>-1</sup>) finales en Esters éthylique (A), Alcools supérieur (B) en fin de fermentation, dosage fait en LC-MS. Ces résultats du test statistique de Tukey sont représentés sous la forme de lettres minuscules. Abréviations : LSA (levures sèches actives), SN (Sauvignon), SC (Sauvignac), 1%/ 3%/ 1%+PT4/ 1%+O2 (correspond aux conditions de fermentation avec ajout de bourbes, de PT4 ou d’oxygène).

## Résumé / Summary

Même si les variétés innovantes peuvent conférer des propriétés de résistance face aux maladies cryptogamiques, il est important de caractériser le potentiel œnologique de ce nouveau matériel végétal. En ce sens, les premières recherches menées sur le Sauvignac avaient montré que la nutrition lipidique apportée par l'ajout de bourbes avait un impact majeur sur le contrôle de la cinétique fermentaire. Dans ce travail, une comparaison au cépage traditionnel Sauvignon a été réalisée. Lors de cette étude, différentes stratégies d'apport de lipides ont été testées, par l'ajout de 1% et 3% de bourbes mais également par l'ajout d'un produit commercial PT4 ou encore par ajout d'oxygène. Les résultats ont montré qu'un effet millésime avait un fort impact sur les résultats car les moûts initiaux n'ont pas les mêmes caractéristiques entre les vendanges 2021 et 2022 pour le Sauvignac. Au vu de l'ensemble des résultats, le paramètre qui influence le plus la synthèse métabolique est l'ajout d'oxygène avec notamment une diminution de la concentration des arômes fermentaires.

**Mots clé :** fermentation, levure, oxygène, arômes, métabolisme

---

Even if innovative grape varieties can confer resistance properties against cryptogamic diseases, it is important to characterize the oenological potential of this new plant material. Initial research on Sauvignac showed that the lipid nutrition provided by the addition of solid particles had a major impact on the control of fermentation kinetics. In this study, a comparison with the traditional Sauvignon grape variety was done. In this work, different strategies for lipid addition were tested, by adding 1% and 3% solid particles, a commercial PT4 product and oxygen. The results showed that a vintage effect had a strong impact on the results, as the initial musts do not have the same characteristics between the 2021 and 2022 harvests for Sauvignac. In view of all the results, the parameter with the greatest influence on metabolic synthesis is the addition of oxygen, which notably reduces the concentration of fermentative aromas.

**Key words:** fermentation, yeast, oxygen, aromas, metabolism